



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014013388-7 A2

(22) Data do Depósito: 03/06/2014

(43) Data da Publicação: 29/12/2015

(RPI 2347)



(54) Título: NANOPARTÍCULA, PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS ENCAPSULADOS SIMULTANEAMENTE

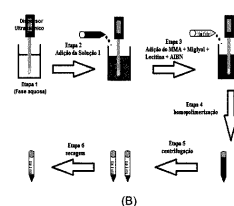
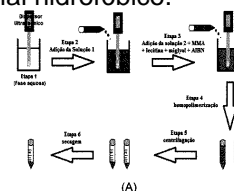
(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 31/40; A61K 47/02; A61K 47/30; A61P 35/00; (...)

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) Inventor(es): PAULO EMÍLIO FEUSER, MARCIO NELE DE SOUZA, EDUARDO RICCI JUNIOR, CLAUDIA SAYER, PEDRO HENRIQUE HERMES DE ARAÚJO

(74) Procurador(es): ROZANGELA CURTI PEDROSA

(57) Resumo: NANOPARTÍCULA, PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS ENCAPSULADOS SIMULTANEAMENTE. Dessa forma, a presente invenção revela uma nanopartícula que compreende pelo menos um fármaco, nanopartículas magnéticas e pelo menos um polímero e um processo caracterizado fundamentalmente pela encapsulação in-situ de fármacos e NPMs pela técnica de polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação que inclui na primeira etapa um fármaco solúvel em um solvente polar e na segunda etapa inclui um monômero hidrofóbico, iniciador hidrofóbico, surfactante, coestabilizador e um material hidrofóbico.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

NANOPARTÍCULA, PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E USO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS ENCAPSULADOS
SIMULTANEAMENTE

Campo da Invenção

[0001]A presente invenção refere-se a uma nanopartícula e um processo usado para produção de nanocápsulas contendo nanopartículas magnéticas (NPMs) e fármacos. A presente invenção se situa no campo da nanotecnologia e da farmácia.

Antecedentes da Invenção

[0002]As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , podendo variar de tamanho dependendo do campo de aplicação (SCHAFFAZICK et al, 2003). Ao citar o termo nanopartículas engloba-se também nanoesferas ou nanocápsulas. . Nas nanoesferas o fármaco está homogeneamente disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo assim um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas consistem em um interior núcleo-líquido no qual o fármaco está confinado rodeado por uma matriz polimérica (REIS et al, 2005).

[0003]A vetorização de fármacos é uma operação que visa modular e, se possível, direcionar totalmente a distribuição de uma substância, associando-a a um sistema apropriado, denominado vetor. Os vetores podem ser classificados em três grupos principais: primeira geração (é necessário empregar um modo de administração especial, exemplo: Quimiembolização), segunda geração (não é necessário empregar um modo de administração, exemplo: nanoesferas e nanocápsulas), terceira geração (são capazes de reconhecer o alvo visado, exemplo: anticorpos) (PUISIEUX e ROBLOT-

TREUTEL, 1988). Uma das aplicações mais promissoras para a utilização de nanopartículas poliméricas quando se fala em vetorização de fármacos é o tratamento de câncer, onde podem ser encontrados muitos estudos relacionados a vetorização de fármacos anticancerígenos.

[0004]Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização in situ de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK et al, 2003). Entre os principais métodos para preparação de nanopartículas polimérica in situ podemos destacar a polimerização interfacial, a polimerização em emulsão e a polimerização em miniemulsão. Já na técnica de polimerização com polímeros pré-formados pode-se destacar o método de nanoprecipitação e emulsificação e de evaporação de solvente sendo estes mais conhecidos da indústria farmacêutica.

[0005]Na polimerização em miniemulsão as gotas são sub-micrométricas. Na primeira etapa do processo de polimerização, pequenas gotas de 50-500 nm são formadas pela dispersão de um sistema contendo a fase dispersa (monômero, co-estabilizador) sendo que o iniciador pode ser hidrofílico ou hidrofóbico, e a fase contínua (água e surfactante). O sistema é obtido através de um equipamento de alto cisalhamento, como por exemplo, sonda de ultrassom. Na segunda etapa, estas gotas são polimerizadas pela adição de iniciador e/ou aumento da temperatura. O tamanho das gotas, diretamente depois do preparo da miniemulsão, depende principalmente das quantidades e tipos de surfactante e co-estabilizador e das condições de dispersão (LANDFESTER, 2006).

[0006]A técnica de nanoprecipitação ocorre por uma rápida dessolvatação do polímero quando a fase orgânica é adicionada, sob agitação, à fase aquosa (não-solvente) contendo surfactante. A precipitação do polímero é resultado de uma rápida difusão do solvente para o meio aquoso. O fármaco é imediatamente aprisionado ao polímero durante a precipitação. Esta técnica de

nanoprecipitação permite a produção de nanopartículas pequenas (100-300 nm) com distribuição unimodal estreita e uma grande variedade de polímeros pré-formados podem ser utilizados, dependendo da aplicação de cada material preparado. Este método não necessita de um alto cisalhamento e nem de altas temperaturas. Além disso, os surfactantes muitas vezes não são necessários e os solventes tóxicos geralmente são excluídos deste processo (BILATI et al, 2004; FESSI et al, 1989; REIS et al, 2006). YOO et al (2001) realizaram um experimento para encapsular lisozima, resumidamente, foi promovida a difusão de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO), contendo ambas proteínas e o polímero (PLGA) em uma solução aquosa com poloxamer 407. Este trabalho evidenciou que a técnica de nanoprecipitação pode ocorrer mesmo com outros solventes e pode levar a formação de nanopartículas, utilizando fármacos hidrofílicos.

[0007]A ftalocianina de zinco (FtZn) é um fotossensibilizador de segunda geração, que apresenta uma elevada absorvidade molar na região do espectro eletromagnético correspondente a luz vermelha, sendo esta a região que apresenta a máxima transmitância de luz através dos tecidos, e portanto, a mais utilizada no tratamento de tumores. Entretanto, assim como a FtZn, a maior parte dos fotossensibilizantes possui características hidrofóbicas, o que constitui outro desafio. Pois, sendo pouco solúveis em água são difíceis de serem administradas em veículos fisiologicamente aceitáveis, podendo também ter a tendência de se agregar sendo este outro efeito negativo (STORPIRTIS et al, 2009). A baixa seletividade e a baixa solubilidade em água podem ser resolvidas com o desenvolvimento de técnicas de liberação apropriadas e com a encapsulação do fármaco.

[0008]Nanopartículas de óxidos de ferro são estudadas há algumas décadas. Desde o primeiro trabalho publicado por STONER e WOLHFARTH (1948) muitos outros foram desenvolvidos. O interesse nestas nanopartículas magnéticas (NPMs) aumentou quando na década de 60 evidenciou-se que estes óxidos de ferro poderiam ser muito úteis para aplicações biomédicas.

Hoje as NPMs são usadas na ressonância magnética por Imagem (MRI), que tem aplicações bem conhecidas na área de diagnósticos (ZHANG et al, 2002); na liberação de fármacos , (GUPTA, 2004); e na hipertermia, que é utilizada para “queimar” células cancerosas muitas vezes em combinação com a quimioterapia (LANDFESTER e RAMÍRES, 2003). A encapsulação simultânea de NPMs com um fármaco específico desperta grande interesse pelo potencial de um efeito sinérgico de atuação. Pode-se mencionar o trabalho de ZAVISOVA et al, (2007) que encapsularam a Indometacina, um agente anti-inflamatório, e nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com poli (ácido - lático) (PLA) via nanoprecipitação e KONERACKÁ et al, (2008) que encapsularam o taxol, um agente quimioterápico, e nanopartículas de Fe_3O_4 com poli(ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) via nanoprecipitação. Vale destacar que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que tenha realizado a encapsulação simultânea de fármacos e NPMs via a técnica de polimerização em miniemulsão. Particularmente o uso do poli (metacrilato de metila) – PMMA – se destaca nessa área, uma vez que esse material é biocompatível e o monômero metacrilato de metila – MMA – apresenta baixa toxicidade. Por essa razão, o MMA e o PMMA são amplamente empregados para preparação de cimentos dentais, cimentos ósseos, próteses ósseas e remédios usados para administração oral. Além disso, essa classe de polímeros pode ser conjugada com proteínas, biomoléculas e ingredientes farmacêuticos ativos, resultando em produtos promissores na área de sistemas de liberação de fármacos, cultura de células, bioprocessos enzimáticos, dentre outros (UCHEGBU E SCHATZLEIN, 2006).

[0009] Quanto ao estado da técnica, a busca de anterioridade identificou os seguintes pedidos de patente relativos ao nanopartículas magnéticas e fármacos encapsulados:

[0010] O documento US 2010/0292564A1 relata o uso de nanopartículas magnéticas (sem encapsulação com material polimérico) para o tratamento do

câncer via hipertermia. O documento, entretanto, não revela o uso de encapsulação simultânea com outros fármacos.

[0011]O documento US 2009/0074670 relata o uso NPMs (encapsulada com material polimérico) para o tratamento do câncer também via Hipertermia. O documento, entretanto, não revela o uso de encapsulação simultânea com outros fármacos.

[0012]O documento US 7,081,489 relata o método de nanoencapsulação de nanopartículas magnéticas via polimerização em emulsão para aplicação na área biomédica e tecnológica.

[0013]Em relação à terapia fotodinâmica, o documento US 6,693,093B2 relata o uso de sistemas de liberação de fármacos para o tratamento do câncer via terapia fotodinâmica utilizando copolímeros em bloco para obtenção de micropartículas. Vale ressaltar, que estas micropartículas não contém NPMs.

[0014]Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0015]A preparação de nanopartículas poliméricas produzidas via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação apresenta como uma das grandes vantagens em relação à nanopartículas lipídicas e de polímeros previamente sintetizados (por exemplo, polímeros naturais, como PHBV, e sintéticos, como PLLA, PLGA, PCL...) produzidas por emulsão e evaporação de solvente a alta estabilidade, distribuição de tamanho de partículas estreita e uma alta eficiência de encapsulação.

[0016]Adicionalmente, a partir deste método é possível a encapsulação simultânea de NPMs e FtZn para o tratamento do câncer visando um efeito sinérgico entre a terapia fotodinâmica e a hipertermia. Vale ressaltar que não há nenhum produto com as características descritas na presente invenção, que

são nanopartículas poliméricas contendo um fármaco para terapia fotodinâmica (no caso a FtZn) e simultaneamente, NPMs para tratamento do câncer por hipertermia.

[0017] Dessa forma, a presente invenção revela uma nanopartícula que compreende pelo menos um fármaco, nanopartículas magnéticas e pelo menos um polímero e um processo caracterizado fundamentalmente pela encapsulação in-situ de fármacos e NPMs pela técnica de polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação que inclui na primeira etapa um fármaco insolúvel em um solvente apolar e na segunda etapa inclui um monômero hidrofóbico, iniciador hidrofóbico, surfactante, co-surfactante e um material hidrofóbico.

[0018] É, portanto, um objeto da presente invenção uma nanopartícula que compreende

- pelo menos um fármaco;
- nanopartículas magnéticas; e
- pelo menos um polímero.

[0019] Em uma realização preferencial, o fármaco é um fotossensibilizador, a nanopartícula magnética é nanopartícula de Fe_3O_4 , e o polímero é PMMA (polimetacrilato de metila).

[0020] Em uma realização preferencial o dito fotossensibilizador é ftalocianina.

[0021] É adicionalmente objeto da presente invenção uma nanopartícula que é produzida por um processo de encapsulação simultânea de nanopartículas magnéticas e fármacos que compreende as etapas de:

- a) adição de uma solução de fármaco;
- b) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;
- c) polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação.

[0022] É adicionalmente objeto da presente invenção, um processo de encapsulação simultânea de nanopartículas magnéticas e fármacos que compreende as etapas de:

- a) adição de uma solução de fármaco;
- b) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;
- c) polimerização em miniemulsão.

Em uma realização preferencial, a polimerização é em miniemulsão com auxílio de nanoprecipitação.

Em uma realização preferencial, o processo compreende as etapas de:

- a) adição de água;
- b) adição de uma solução de fármaco;
- c) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;
- d) adição de um surfactante;
- e) adição de um co-estabilizador;
- f) adição de um iniciador;
- e) submissão a ultrassom em banho de gelo; e
- f) submissão a um banho termostático;

[0023] Em uma realização preferencial, o fármaco é um fotossensibilizador, os monômeros são de MMA (Metacrilato de metila) e as nanopartículas magnéticas são de Fe_3O_4 .

[0024] É também objeto da presente invenção, uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer que contém:

- (i) fármaco e nanopartículas magnéticas encapsulados simultaneamente, e
- (ii) pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0025] É também objeto da presente invenção, o uso de nanopartículas magnéticas e fármacos encapsulados simultaneamente na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

[0026] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos técnicos no assunto e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0027] Para completar a descrição da idéia e com o objetivo de facilitar a compreensão de suas características é apresentada uma série de figuras com caráter ilustrativo e não limitativo:

[0028] Figura 1. Encapsulação simultânea da ftalocianina de zinco com nanopartículas magnéticas (A), encapsulação da ftalocianina de zinco (B) via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/FtZn).

[0029] Figura 2. MET das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs (PMMA/FtZn/NPMs).

[0030] Figura 3. MET das nanopartículas poliméricas contendo NPMs.

[0031] Figura 4 . MET das nanopartículas poliméricas contendo PMMA/FtZn.

[0032] Figura 5. Espectros de absorção no UV-Vis da FtZn e PMMA/FtZn/NPMs.

[0033] Figura 6. Difratoograma de Raio-X das nanopartículas poliméricas contendo FtZn. As amostras analisadas foram NPMs (A), PMMA (B), PMMA/NPMs (C) e PMMA/FtZn/NPMs (D).

[0034] Figura 7. Análise de TGA das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs.

[0035] Figura 8. Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).

[0036] Figura 9. Conversão gravimétrica das amostras de PMMA/NPMs, PMMA e PMMA/FtZn/NPMs.

[0037] Figura 10. Perfil de liberação da FtZn das nanopartículas de PMMA/FtZn e PMMA/FtZn/NPMs.

[0038] Figura 11. Estudos de toxicidade (ausência de luz) e de atividade fotobiológica (irradiação de luz: 40 J/cm²) em cultura de células A549 das nanopartículas de PMMA contendo ou não FtZn. Dose por poço: 5 µg FtZn e tempo de incubação de 4 horas. Média ± desvio padrão de seis experimentos independentes. *Significativamente menor do que o controle na ausência de luz (p < 0,05 ANOVA).

Descrição Detalhada da Invenção

[0039] A presente invenção revela uma nanopartícula e um processo caracterizado fundamentalmente pela encapsulação in-situ de fármacos e NPMs pela técnica de polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação que inclui na primeira etapa um fármaco solúvel em um solvente polar e na segunda etapa inclui um monômero hidrofóbico, iniciador hidrofóbico, surfactante, co-estabilizador e um material hidrofóbico.

Veículo farmaceuticamente aceitável

[0040] O veículo farmaceuticamente aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmaceuticamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

Fotohipertermia

[0041] O encapsulamento da FtZn com NPMs tem sido reconhecido como uma técnica promissora para o tratamento do câncer por possibilitar a ação sinérgica dos diferentes tipos de tratamento. A hipertermia é utilizada para “queimar” células cancerosas, muitas vezes em combinação com a quimioterapia. A TFD utilizada para destruir as células cancerígenas com auxílio de uma luz visível.

Fotossensibilizador

[0042]Entende-se por fotossensibilizador uma substância capaz de sensibilizar um material para raios aos quais normalmente não é sensível. A ftalocianina de zinco (FtZn) é um fotossensibilizador de segunda geração, que apresenta uma elevada absorvidade molar na região do espectro eletromagnético correspondente a luz vermelha, sendo esta a região que apresenta a máxima transmitância de luz através dos tecidos, e portanto, o mais utilizado no tratamento de tumores.

Fármaco

[0043]Entende-se como fármaco qualquer substância química conhecida e de estrutura química definida dotada de propriedade farmacológica. Em termos correntes, a palavra fármaco designa todas as substâncias utilizadas em farmácia e com ação farmacológica, ou pelo menos com interesse médico.

Realização Preferencial

[0044]Os exemplos aqui descritos devem ser encarados como algumas das inúmeras formas de realizar a invenção, não devendo, portanto, serem encarados de forma restritiva, mas sim ilustrativa.

Procedimento da síntese das nanopartículas de PMMA com NPMs e FtZn

[0045]A FtZn é um fármaco que apresenta características hidrofílicas intermediárias, ou seja, tem baixa afinidade pela água e por compostos apolares. Isto cria uma dificuldade adicional ao se tentar a miniemulsão direta, pois o monômero é apolar e não consegue solubilizar a FtZn diretamente na fase orgânica. A solubilidade da FtZn em solventes orgânicos polares é relativamente elevada, o que torna possível a utilização da técnica de nanoprecipitação para dispersar este composto na fase aquosa sob a forma de nanopartículas. Para isso, é necessário que este solvente orgânico polar seja solúvel na fase aquosa, como, por exemplo, N-metil pirrolidona (NMP) (GOVENDER et al, 1998), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e a acetona. No entanto, é importante que este solvente possa ser facilmente

retirado do meio contínuo por evaporação, desta forma, dá-se a preferência pela utilização de solventes voláteis.

ETAPA 1

[0046] Na primeira etapa em um béquer de 50 a 200mL, preferencialmente de 100 mL, adiciona-se a fase aquosa (apenas a água). O dispersor ultrassônico (homogenizador Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500) é ligado (etapa 1) e adiciona-se com um conta gotas 1 a 3g de uma solução contendo 0,5 a 1%, preferencialmente 0,5%, de FtZn em relação ao solvente (N-metil pirrolidona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida) bem lentamente, o solvente, neste caso a NMP, tende a migrar para a fase aquosa, enquanto que a FtZn (não estabilizada) ficará dispersa na fase aquosa sob a forma de nanopartículas.

ETAPA 2

[0047] A segunda etapa do processo é a adição da fase orgânica contendo: 1 a 3g, preferencialmente 2g, de metacrilato de metila (monômero) com 0,1 a 1g, preferencialmente 0,5 g, de nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico, 0,08 a 1,2g, preferencialmente 0,08 g, de lecitina (surfactante), 0,05 a 1,2g, preferencialmente 0,08 g, de miglyol 812 (co-estabilizador) e 0,03 a 0,06g, preferencialmente 0,04 g, de azobisisobutironitrila (iniciador) no sistema. O sistema foi submetido ao ultrassom em banho de gelo por 1 a 10, preferencialmente, 5 minutos com amplitude de 50 a 90%, preferencialmente 70%. Posteriormente a miniemulsão foi adicionada em dois tubos do tipo falcon estéril e colocada em um banho termostático há uma temperatura de 70 a 80°C, preferencialmente 70°C até sua completa polimerização.

ETAPA 3

[0048] Após a etapa 2 e posterior resfriamento do sistema as nanopartículas produzidas via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação foram centrifugadas a 15000 rpm por 2 horas. O sobrenadante foi descartado, o material foi lavado e ressuspendido com água destilada e centrifugado a 15000 rpm por mais 2 horas. Na sequência o

sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a vácuo a 60°C por 24hrs.

[0049]A utilização de um surfactante na fase orgânica é essencial nesta técnica de polimerização. Se o surfactante estiver na fase aquosa, o fármaco ao ser disperso na água será estabilizado por este surfactante. Devido a diminuição da tensão interfacial com a água estas nanopartículas de fármaco se tornarão estáveis o que diminuirá a migração do fármaco para as gotas de monômero. Testes realizados no laboratório comprovaram que ao utilizar um surfactante de elevado HLB, como o SDS, disperso na fase aquosa não ocorreu a migração do fármaco para as gotas de monômero, não ocorrendo, portanto, a encapsulação do fármaco pelo polímero formado durante a reação de polimerização.

Materiais e Métodos

[0050]A não ser nos casos explicitamente descritos de forma distinta nos próximos parágrafos, as formulações básicas empregadas nos Exemplos é descrita a seguir. Para a preparação das NPMs utilizou-se os seguintes reagentes: água destilada (H_2O) cloreto férrico ($ClFe_3 \cdot 5H_2O$), sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), hidróxido de amônia (NH_4OH), ácido oléico ($C_{18}H_{34}O_2$) e acetona todos provenientes da VETEC Química. Na encapsulação simultânea da FtZn e NPMs utilizou-se os seguintes reagentes: como monômero o metacrilato de metila (MMA) da ARINOS Química, como iniciador o AIBN (2,2'azo bis-isobutironitrila) (VETEC química), como surfactante a lecitina (Alfa Aesar), como co-surfactante o miglyol 812 (Sazol), como fármaco a ftolacianina de zinco (FtZn), como solvente a N-metil-pirrolidona, ambos provenientes da Sigma Aldrich e água destilada.

[0051]Para o preparo das NPMs estabilizadas com AO utilizou-se um agitador mecânico da marca IKA RW20 Digital, com um impelidor tipo hélice com quatro pás constituindo um sistema de cisalhamento produzindo um fluxo turbulento com uma velocidade de rotação de aproximadamente 700 rpm. Também foi necessário a utilização de um pHmetro da marca Hanna e de uma

ultracentrífuga da marca Beckman-Coulter. Para o preparo da miniemulsão utilizou-se o homogenizador Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500. Este equipamento é constituído de um gerador, um conversor e uma sonda, através da qual são emitidas ondas produzindo uma cavitação no sistema que resulta no rompimento das gotas.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

[0052] Para análise da morfologia das NPMs e das nanopartículas poliméricas utilizou-se a técnica Microscopia Eletrônica Transmissão utilizando um equipamento da marca JEOL, modelo JEM 2100F de 100kV, que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

[0053] Na preparação das nanopartículas poliméricas foi colocada uma gota de látex diluído em água destilada (1 g de látex para 10g de água destilada) em uma grade de cobre recoberta por um filme de parlódio. Depois de 24hrs as grades contendo as amostras secas foram recobertas com carbono. O mesmo procedimento foi realizado para as análises do material magnético.

Termogravimetria (TGA)

[0054] A termogravimetria baseia-se no acompanhamento da mudança de massa em função da variação de temperatura de programação controlada. A amostra sólida pode sofrer uma taxa de aquecimento em geral, na faixa de 1 a 50°C/min. O equipamento é composto basicamente de uma micro-balança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás (inerte ou oxidante).

Cromatografia Gasosa (CG)

[0055] A determinação da concentração de monômero residual após a reação de polimerização em miniemulsão foi feita por Cromatografia Gasosa (CG, Shimadzu GC2010AF), sendo elaborada uma curva de calibração com diferentes concentrações de metacrilato de metila (MMA) em função da área do pico referente ao mesmo.

Gravimetria

[0056]A conversão foi obtida através de dados gravimétricos, onde uma alíquota da amostra é retirada periodicamente e a reação é interrompida imediatamente com a adição de uma solução de 1% em massa de hidroquinona em cápsulas previamente pesadas de alumínio.

[0057]A conversão obtida por gravimetria (X_{grav}) é a razão entre a massa do polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. A massa de polímero é calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação de uma amostra de látex em uma estufa com convecção forçada que se encontra a temperatura constante de 70°C. Para calcular a massa de polímero é necessário subtrair a massa de hidroquinona adicionada e a fração de sólidos não poliméricos, tais como iniciador, surfactante e co-estabilizador, presentes no resíduo seco.

Difração de Raio-X

[0058]A fase cristalina das nanopartículas poliméricas foi identificada por medidas de difração de Raios-X utilizando uma radiação cobre $K\alpha$ (1,54056 Å) a 45 kV/40 mA em um difratômetro de Raios-X, modelo Xpert-Pro, numa velocidade de varredura angular de 2θ e com um tempo de passo de 1 segundo.

Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)

[0059]O MAV nos permite obter informações a respeito das propriedades magnéticas de um determinado material e classificá-lo de acordo com sua propriedade magnéticas, seja ela, ferrimagnética, ferromagnética ou superparamagnética. As medidas de magnetização foram realizadas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV), modelo EV9 da marca microsense, As amostras analisadas no MAV foram preparadas colocando-se uma pequena quantidade de amostra com uma massa conhecida no interior de uma cápsula de vidro e esta cápsula foi presa por um tubo de quartzo e fixada verticalmente sobre duas bobinas. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 a -20 KOe e as medidas realizadas a temperatura ambiente.

Espectrofotômetro UV/Vis

[0060]As análises de espectrofotometria de absorção na faixa do Visível foram utilizadas para identificação e quantificação da FtZn puro e no material polimérico.

Determinação dos espectros de absorção na faixa do UV/Vis

[0061]Na determinação do comprimento de onda de excitação da FtZn, efetuou-se uma varredura em espectrofotômetro da marca Hitachi modelo 1900, na faixa de 500 a 800 nm (solução de 1 µg/ml de FtZn em N-metil-pirrolidona). O espectro de absorção obtido auxiliou na fixação do comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) do fotossensibilizante. Esses experimentos foram efetuados utilizando-se cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

[0062]Obtenção da Curva de analítica da FtZn

[0063]Para quantificar a concentração da FtZn na amostra, uma curva de calibração foi previamente elaborada, onde soluções padrões de N-metil-pirrolidona contendo concentrações conhecidas de FtZn, foram analisadas no comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 670 nm. A curva analítica foi obtida relacionando-se os valores da concentração da FtZn (µg/ml), no eixo da abscissa (x), com os valores de emissão de fluorescência obtidos para cada concentração, no eixo da ordenada (y). Os dados estão apresentados na equação 1.

$$\text{Abs} = 0,491x[\text{FtZn}] + 0,099 \quad (\text{Eq 1})$$

$$R^2=0,999$$

[0064]A partir da Eq 1 pode-se determinar a eficiência de encapsulação (%). Na extração do fármaco, uma quantidade conhecida de nanopartículas contendo FtZn (~5 mg) foi rompida com 5 ml de NMP. A solução foi homogeneizada em um sonificador por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 ml da solução de ZnPc foi diluída em balão volumétrico de 10 ml com NMP. A solução foi excitada a 670 nm utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O experimento foi realizado a 25°C. A quantificação da FtZn foi efetuada utilizando-se o método anteriormente descrito. A concentração de

FtZn (μg) foi calculada a partir da intensidade de emissão de fluorescência obtida da amostra e da curva analítica. A EE% das nanopartículas foi calculada a partir da equação abaixo

$$[\text{EE}\%] = \frac{\text{Massa da FtZn obtida nas nanopartículas} \times 100\%}{\text{Massa da FtZn colocada na formulação}} \quad (\text{Eq. 2})$$

[0065] O teor de FtZn nas nanopartículas poliméricas determina o conteúdo de fármaco nas nanopartículas, como a relação da quantidade de fármaco encapsulado com o rendimento de nanopartículas obtido no processo (SOARES, 2009). A concentração de FtZn nas nanopartículas foi calculado de acordo com a equação:

$$[\text{FtZn}(\mu\text{g}/\text{mg})] = \frac{\text{Massa da FtZn obtida nas nanopartículas} \times 100\%}{\text{Massa de rendimento das nanopartículas}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Perfil de Liberação *in vitro*

[0066] O estudo do perfil de liberação foi realizado de acordo com as condições experimentais descritas por Chawla & Amiji (2002) e Ricci Junior & Marchetti (2006a, 2006b). Para a realização das análises de liberação da FtZn, foi utilizado um banho termostatzado com temperatura controlada a 37°C, onde foram imersos béqueres contendo o meio receptor e o sistema de liberação estudado sob agitação magnética. Foram utilizados 40 ml de tampão fosfato salino, pH 7,4, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (TFS-SDS) como meio receptor e amostras de 5mg de nanopartículas liofilizadas foram adicionadas a essa solução receptora. O sistema foi mantido sob proteção da luz. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 3 ml foram retiradas e transferidas para o béquer para a continuação do teste de liberação. O sobrenadante foi analisado pelo método de emissão de fluorescência anteriormente padronizado para a quantificação de FtZn liberada. As concentrações obtidas foram utilizadas para a elaboração do gráfico do perfil

de liberação *in vitro* da FtZn das nanopartículas. O experimento foi realizado em triplicata para cada método de encapsulação.

Avaliação da toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumorais

[0067] A linhagem de células escolhida para a realização dos ensaios de toxicidade e atividade fotobiológica foi a A549 (células de carcinoma de pulmão humano) (LIEBER *et al.*, 1976). Para a utilização das células, a linhagem foi descongelada até atingir a temperatura de 37°C e acondicionada em frasco de cultura de 25 ml contendo 7 ml de meio (Meio Dulbecco's Modificado) DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. A este meio foram acrescentados 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. O frasco de cultura foi mantido em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO₂ durante 48 h. A concentração de células foi medida pelo método de azul de tripan baseado na capacidade das células viáveis em eliminar o corante. As células não coradas são contadas utilizando uma câmara de Neubauer. A suspensão celular foi distribuída na concentração de 1×10^5 células/ml em placa de 96 poços (250 µL) contendo meio de cultura DMEM enriquecido. As placas foram incubadas em estufa por 24 h para a adesão das células. A avaliação de toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células foi realizada com base em estudos já descritos na literatura (RICCI-JÚNIOR e MARCHETTI, 2006).

[0068] Na determinação da viabilidade das células, as células foram incubadas com 230 µl de meio DMEM e 20 µl de solução de MTT (5 mg/ml em TFS) por 3 horas em estufa a 37°C, na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 minutos, o meio contendo o MTT foi retirado, e os cristais de formazan ressuspensos em 200 µl de DMSO para solubilização. A absorbância foi medida em uma leitora de placas do tipo ELISA (THERMOPLATE) nos comprimentos de onda de 540 nm e 630 nm e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento (controle) por meio de análise estatística (ANOVA) utilizando com significância $p < 0,05$.

Morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas

[0069] Na Figura 2 pode-se ver a morfologia e a distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs, sendo possível observar que não houve alterações consideráveis na distribuição do tamanho das partículas e na morfologia quando comparado com as nanopartículas obtidas somente com NPMs (Figura 3) ou FtZn (Figura 4). O tamanho médio das nanopartículas de PMMA/FtZn/NPMs foi de aproximadamente 100nm. Cabe ressaltar que o percentual mássico de óxido de ferro é de aproximadamente 8% nas nanopartículas poliméricas. Como o óxido de ferro possui uma massa específica em torno de $5,2\text{g/cm}^3$, muito superior, portanto, ao do polímero ($\sim 1,1\text{g/cm}^3$), a sua fração volumétrica nas nanopartículas é muito reduzida ($\sim 3\%$ em volume). Desta forma, nem todas as nanopartículas de polímero irão conter NPMs, mesmo porque as NPMs tendem a se agregar. Desta forma, algumas nanopartículas irão conter diversas NPMs enquanto outras não terão nenhuma NPM.

Caracterização espectrométrica e rendimento do processo das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs

[0070] A partir da Figura 5 pode-se observar que a FtZn encapsulada com NPMs e PMMA apresentou o pico de absorção no mesmo comprimento de onda, 670 nm, que a FtZn livre. Ou seja, a encapsulação e a introdução de NPMs na encapsulação da FtZn não influenciaram o comportamento espectroscópico da FtZn. Segundo OLIVEIRA et al. (2004) este é um ponto muito importante para o desenvolvimento de uma nova estrutura contendo FtZn e NPMs, pois indica que não há interação do fármaco com as NPMs.

[0071] A partir das análises espectrométricas pode-se obter a eficiência de encapsulação (EE%), a concentração de FtZn nas nanopartículas poliméricas e o rendimento do processo mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – EE%, concentração mássica de FtZn e rendimento do processo das nanopartículas poliméricas.

Amostras	Rendimento do Processo (%)	Teor de FtZn ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EE%
PMMA/FtZn/NPMs	79 \pm 0,5	1,6	87,6 \pm 0,6

Difração de Raio-X

[0072]A partir da Figura 6 pode-se observar que a FtZn não altera a estrutura cristalina das NPMs. Desta forma, pode-se afirmar que a estrutura cristalina das NPMs não foi afetada pela presença da FtZn.

Análise Termogravimétrica – TGA

[0073]A Figura 7 apresenta o resultado de TGA da amostra de NPMs encapsuladas simultaneamente com FtZn. A concentração residual é de 12% e corresponde ao óxido de ferro presente nas NPMs. Os outros 88% correspondem ao polímero, ou seja, PMMA e AO presente nas NPMs (HONG et al, 2008). A concentração final de óxido de ferro é um pouco superior ao da formulação original e isto se deve a evaporação parcial do AO na estufa, além da possível evaporação de parte do monômero durante a própria reação.

Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs

[0074]Na Figura 8 pode-se observar o comportamento superparamagnético das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs quando expostas a uma temperatura ambiente. O comportamento superparamagnético também se equivale ao baixo valor da M_r e nos pequenos valores de H_c que pode ser visto na Tabela 2.

[0075]Observa-se na Tabela 2 que o valor de M_s quando comparado com o resultado obtido na encapsulação das NPMs sem a FtZn é muito próximo. Por fim, pode-se dizer que a adição de FtZn não interfere nas propriedades magnéticas das NPMs e com isso é possível obter nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs com alto valor de M_s e propriedades superparamagnéticas, possibilitando a liberação do fármaco num alvo

específico quando se utiliza um campo magnético externo (ZAVISOVA et al 2007).

Tabela 2 - Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo FtZn e NPMs

Amostras	Ms (emu/g)	<i>Mr</i> ($\times 10^{-6}$)	Hc (Oe)
Encapsulação de FtZn com NPMs	31	1,3	0,1
Encapsulação das NPms	34	0,9	0,2

Conversão gravimétrica

[0076] Os resultados das medidas de gravimetria durante as reações de polimerização indicam que a conversão atinge uma conversão limite com aproximadamente 2 horas de reação (Figura 9). A conversão final ficou um pouco abaixo de 100% devido, provavelmente, a evaporação parcial do ácido oleico durante a etapa de secagem das amostras para gravimetria, que não foi considerada nos cálculos. Outro fator que pode ter levado a menor conversão gravimétrica é a perda de monômero (MMA) por evaporação durante a etapa de miniemulsificação e durante a etapa de reação. Esta evaporação do monômero pode ocorrer devido à elevada pressão de vapor do MMA e pela vedação deficiente do reator. De fato, a conversão final do monômero efetivamente presente no reator ficou sempre muito próxima a 100%, fato este comprovado por análises de monômero residual por cromatografia gasosa.

[0077] O estudo da cinética das reações é importante para analisar a conversão total do monômero em relação ao tempo e para saber se o material incorporado pode afetar a velocidade de reação. Adicionalmente, é importante frisar que para estudos com finalidade de aplicação na área biomédica é essencial a conversão total do monômero para evitar possíveis efeitos tóxicos do monômero residual.

[0078] Na Figura 7 pode-se verificar uma redução da velocidade de reação em relação às reações sem NPMs. Essa diminuição da taxa de reação pode ser devido à reação do iniciador com o ferro presente no meio reacional formando óxido de ferro, tal como Fe_2O_3 , reduzindo a concentração de radicais livres no meio reacional (HONG et al, 2004). Outra possibilidade é a reação dos radicais livres com o ácido oléico que recobre as nanopartículas de óxido de ferro gerando radicais com baixa reatividade.

Perfil de liberação da FtZn

[0079] A liberação das nanopartículas contendo FtZn foi de modo sustentado e lento como pode ser observado na Figura 10. Nas primeiras horas apenas 2% da FtZn foi liberada, e em 20 horas cerca de 10% da FtZn contida nas

nanopartículas foi liberada na amostra PMMA/FtZn/NPMs. Enquanto que na amostra de PMMA/FtZn apenas 5-10% da FtZn foi liberada. Depois de aproximadamente 7 dias de experimento a amostra PMMA/FtZn/NPMs liberou cerca de 50% da FtZn, enquanto que a amostra PMMA/FtZn liberou cerca de 35% do fármaco. Nos perfis de liberação nenhuma das amostras apresentou efeito “burst”, ou seja, nenhuma das amostras apresentou altas taxas de fármacos liberadas rapidamente. Esta ausência do efeito “burst” pode ser um indicativo que a FtZn esteja homogeneamente dispersa na matriz polimérica das nanopartículas e de que o processo seja por difusão e não por desorção do fármaco adsorvido a superfície das nanopartículas. Outro ponto importante na liberação sustentada e lenta do fármaco se deve a utilização de um polímero que não se degrada rapidamente em meio aquoso.

Avaliação da toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumorais

[0080]No ensaio de atividade fotobiológica, observou-se, inicialmente, que a luz isoladamente não foi capaz de induzir efeito citotóxico sobre a cultura de células ($p > 0,05$), uma vez que a viabilidade celular foi mantida em 90% após a irradiação das células com dose de 40 J/cm^2 . KOLÁROVÁ et al. (2003) irradiaram células de melanoma humano (G361) com luz visível e observaram que a viabilidade das células permanecia acima de 90% após irradiação de luz em doses de 0,5 a 150 J/cm^2 . As nanopartículas de PMMA vazias também apresentaram baixa toxicidade na presença de luz ($p > 0,05$). Por outro lado, as nanopartículas contendo FtZn induziram efeito citotóxico nas células A549 após a irradiação com luz. Houve uma redução significativa da viabilidade celular para 22% no caso das nanopartículas contendo FtZn e ($p < 0,05$; em relação o controle) e redução para 30% no caso das nanopartículas contendo FtZn e NPMs encapsuladas com nanopartículas poliméricas ($p < 0,05$; em relação ao grupo controle). Os estudos de toxicidade e de atividade fotobiológica foram importantes para confirmar que a toxicidade das nanopartículas vazias e contendo FtZn é baixa na ausência de luz.

Reivindicações

NANOPARTÍCULA, PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS ENCAPSULADOS SIMULTANEAMENTE

1. Nanopartícula, **caracterizada** por compreender:
 - pelo menos um fármaco;
 - nanopartículas magnéticas; e
 - pelo menos um polímero.
2. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** em que o fármaco é um fotossensibilizador, a nanopartícula magnética é nanopartícula de Fe_3O_4 , e o polímero é PMMA (polimetacrilato de metila).
3. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** em que o fotossensibilizador é ftalocianina.
4. Nanopartícula, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** por ser produzida por um processo de encapsulação simultânea de nanopartículas magnéticas e fármacos que compreende as etapas de:
 - a) adição de uma solução de fármaco;
 - b) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;
 - c) polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação.
5. Processo de encapsulação simultânea de nanopartículas magnéticas e fármacos, **caracterizado** por compreender as etapas de:
 - a) adição de uma solução de fármaco;
 - b) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;

c) polimerização em miniemulsão.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela polimerização ser polimerização em miniemulsão com auxílio de nanoprecipitação.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) adição de água;
- b) adição de uma solução de fármaco;
- c) adição de uma solução de monômeros com nanopartículas magnéticas;
- d) adição de um surfactante;
- e) adição de um co-estabilizador;
- f) adição de um iniciador;
- e) submissão a ultrassom em banho de gelo; e
- f) submissão a um banho termostático;

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fármaco ser um fotossensibilizador, os monômeros serem de MMA (Metacrilato de metila) e as nanopartículas magnéticas serem de Fe_3O_4 .

9. Composição farmacêutica para o tratamento de câncer **caracterizada** por conter:

- (i) fármaco e nanopartículas magnéticas encapsulados simultaneamente, e
- (ii) pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável.

10. Uso de nanopartículas magnéticas e fármacos encapsulados simultaneamente **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

Figuras

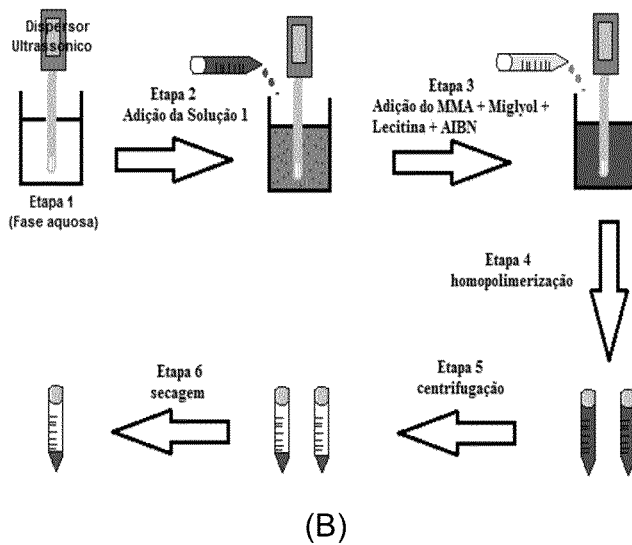
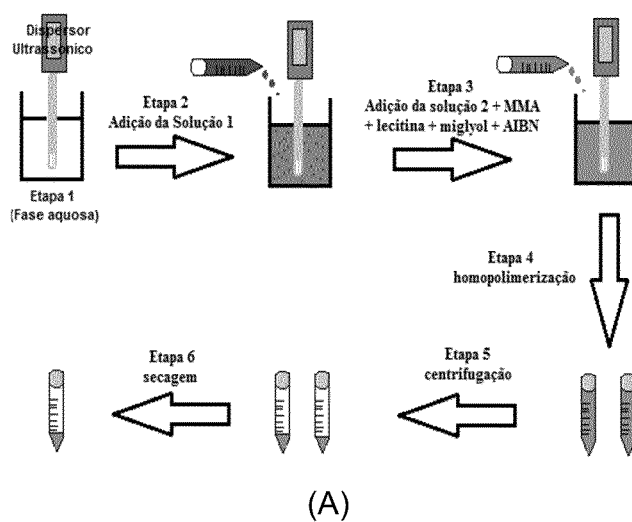


Figura 1

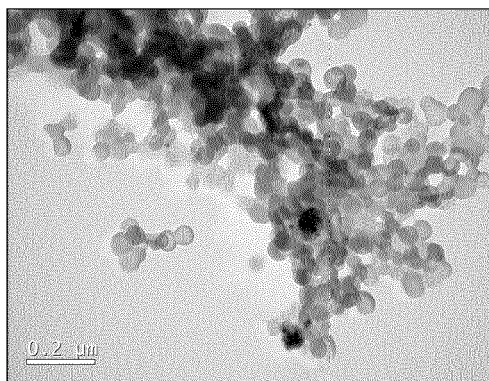


Figura 2

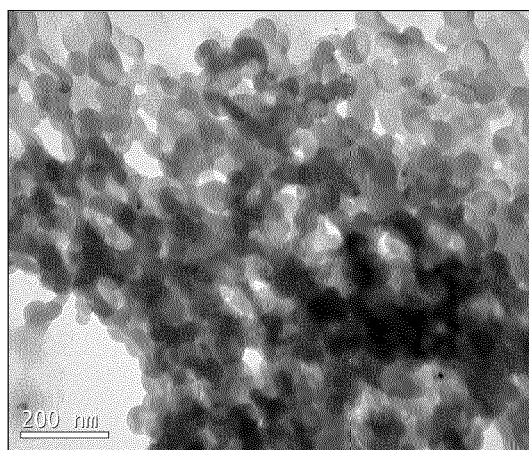


Figura 3

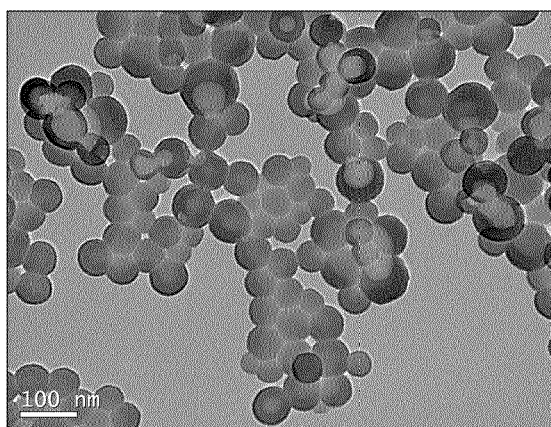


Figura 4

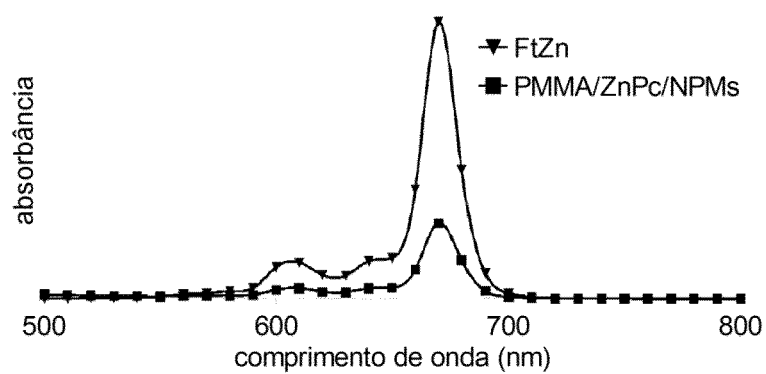


Figura 5

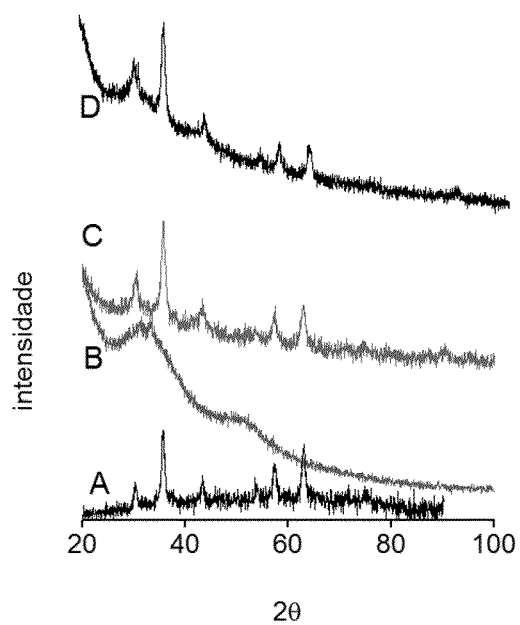


Figura 6

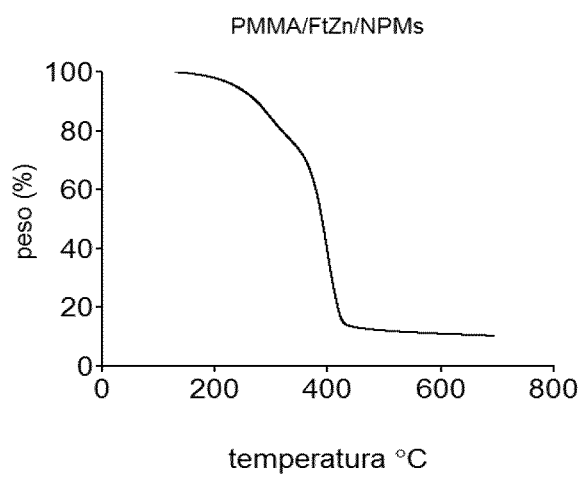
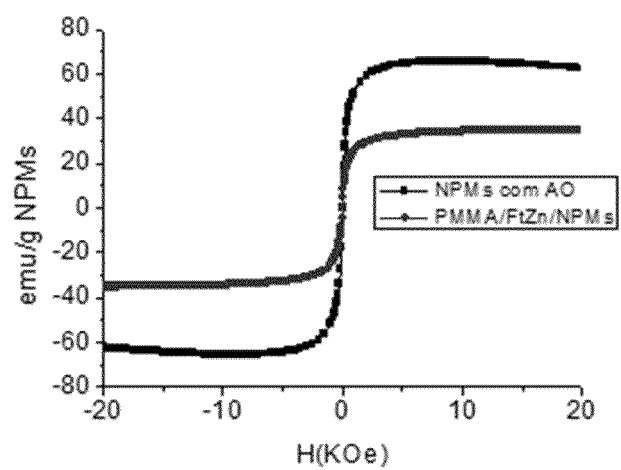
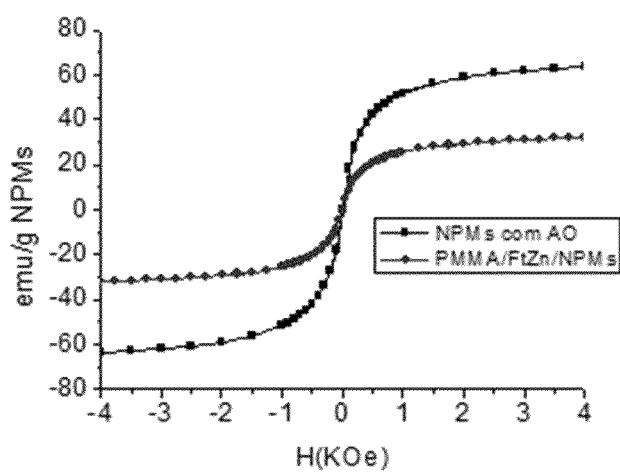


Figura 7



(A)



(B)

Figura 8

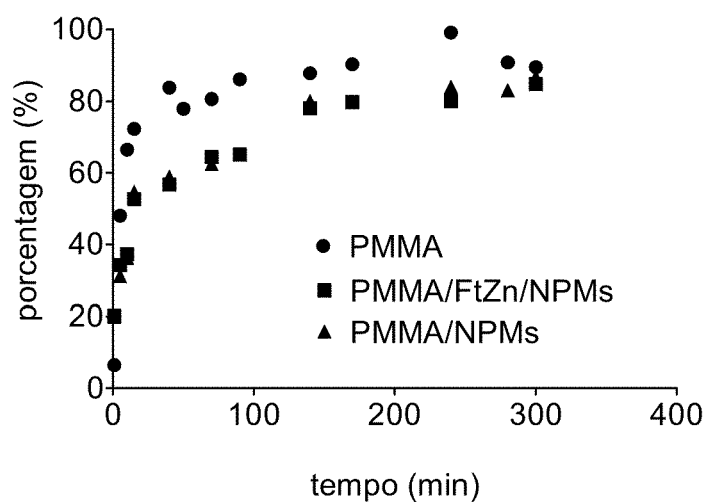


Figura 9

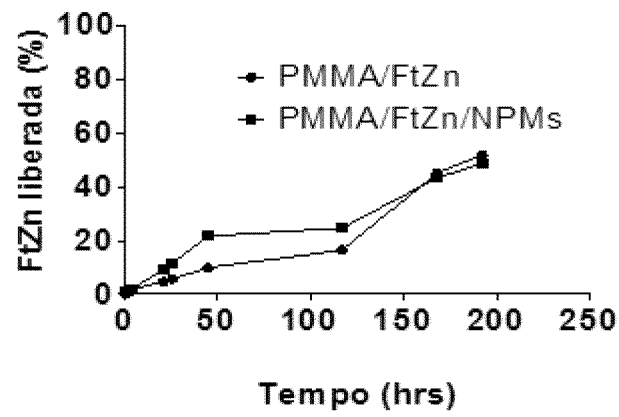


Figura 10

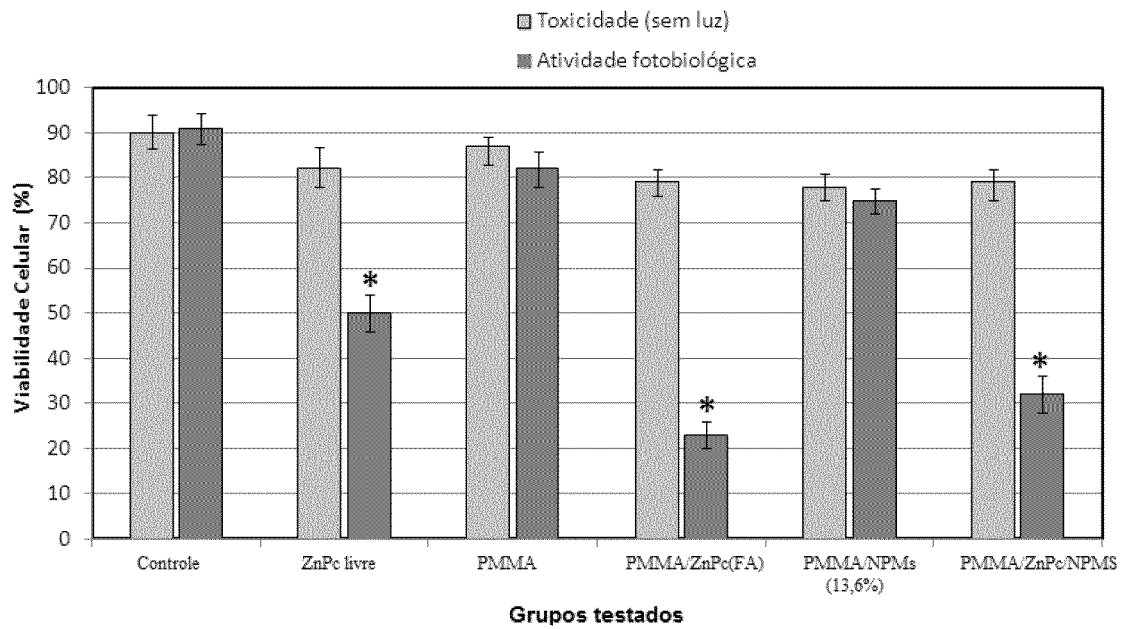


Figura 11

Resumo

NANOPARTÍCULA, PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER E USO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E FÁRMACOS ENCAPSULADOS
SIMULTANEAMENTE

Dessa forma, a presente invenção revela uma nanopartícula que compreende pelo menos um fármaco, nanopartículas magnéticas e pelo menos um polímero e um processo caracterizado fundamentalmente pela encapsulação *in-situ* de fármacos e NPMs pela técnica de polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação que inclui na primeira etapa um fármaco solúvel em um solvente polar e na segunda etapa inclui um monômero hidrofóbico, iniciador hidrofóbico, surfactante, co-estabilizador e um material hidrofóbico.